

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 許出願公開番号

特開平9-140379

(43) 公開日 平成9年(1997)6月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N	9/24		C 1 2 N	9/24
D 2 1 C	9/00		D 2 1 C	9/00
// C 1 2 P	19/14		C 1 2 P	19/14
(C 1 2 N	9/24			Z
C 1 2 R	1: 645)			

審査請求 未請求 請求項の数 7 書面 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-339837

(22) 出願日 平成7年(1995)11月20日

(71) 出願人 000010087

東陶機器株式会社

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号

(72) 発明者 森山 康司

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内

(72) 発明者 広瀬 徹

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内

(72) 発明者 荒井 基夫

大阪府堺市鴨谷台三丁2番20-204号

(54) 【発明の名称】 新規中性キシラナーゼおよびその製造法

(57) 【要約】

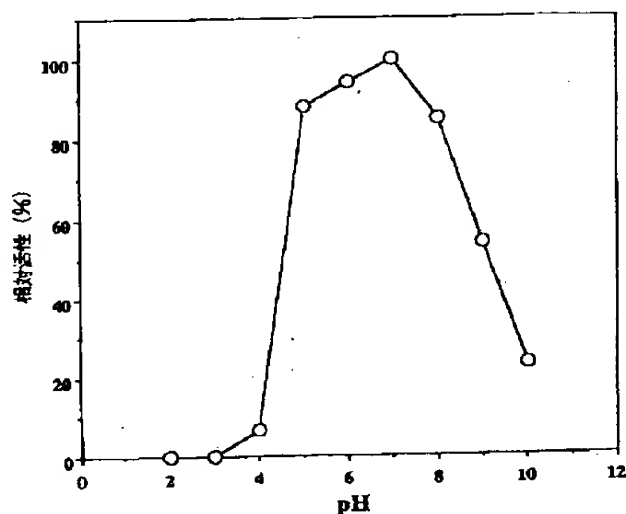
【目的】 産業的に有望な未利用キシランを中性付近で強力に分解することのできる、糸状菌由来の新規中性キシラナーゼを提供する。

【構成】 下記の理化学的性質を有する新規中性キシラナーゼ。

(a) 作用および基質特異性: 各種キシランおよびキシロテトラオース以上のキシロオリゴ糖に特異的に作用し、その $\beta$ -キシロシド結合をエンド型の機作により切断して、主にキシロース、キシロビオース、キシロトリオースなどの低分子量のキシロオリゴ糖を生成する。

(b) 最適pH: 最適pHは約7.0である。

(c) 安定pH: 安定pHは37℃、15分間の処理条件において、pH6.0~10.0で安定である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する新規中性キシラナーゼ。

(a) 作用および基質特異性：各種キシランおよびキシロテトラオース以上のキシロオリゴ糖に特異的に作用し、そのb-キシロシド結合をエンド型の機作により切断して、主にキシロース、キシロビオース、キシロトリオースなどの低分子量のキシロオリゴ糖を生成する。

(b) 最適pH：最適pHは約7.0である。

(c) 安定pH：安定pHは37℃、15分間の処理条件において、pH6.0~10.0で安定である。

(d) 最適温度：最適作用温度は50℃である。

(e) 安定温度：pH7.0で、20分間の処理条件において、40℃まで安定であるが、80℃においても15%程度の活性が残存する。

(f) 分子量：約22,500 (SDS電気泳動法)である。

(g) 等電点：約4.7である。

【請求項2】 アクレモニウム (*Acremonium*) 属菌から得られる、請求項1記載の新規中性キシラナーゼ。

【請求項3】 アクレモニウム エスピー (*Acremonium* sp.) TOTO-9304株から得られる、請求項1記載の新規中性キシラナーゼ。

【請求項4】 アクレモニウム属に属し、請求項1記載のキシラナーゼ産生能を有する微生物を培養する工程と、該工程で得られた培養物より該キシラナーゼを分離する工程とを含んでなる、新規中性キシラナーゼの製造法。

【請求項5】 前記微生物の培養がpH6.0~11.0の中性~アルカリ性で行われる、請求項4記載の新規中性キシラナーゼの製造法。

【請求項6】 前記微生物がアクレモニウム エスピー TOTO-9304株である請求項4記載の新規中性キシラナーゼの製造法。

【請求項7】 アクレモニウム エスピー TOTO-9304株 (FERMP-13639)。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な中性キシラナーゼおよびその製造法に関する。さらに詳しくは、アクレモニウム属に属する微生物より得られる新規なエンド型中性キシラナーゼおよびその製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】キシランはヘミセルロースの一種で、キシロースが $\alpha$ -1,4-結合した主鎖に種々の側鎖が結合したヘテロ多糖であり、広葉樹、イネ科植物などでは20~40%も含まれている。この内、稲ワラ、麦ワラ、サトウキビバガス、小麦フスマなどの農産廃棄物はキシランを多量に含有するにもかかわらず、産業的には

未利用でありそのほとんどが廃棄されている。このキシランをエンド的に加水分解する酵素がキシラナーゼであり、細菌類およびカビ・キノコ等の糸状菌類が生産することが知られている。

【0003】このうち、強力なキシラナーゼ生産菌としては糸状菌であるトリコデルマ属菌が従来知られていたが、近年になってタロミセス属菌 (特開昭57-146576)、アクレモニウム属菌 (特公平1-21957)、ケトミウム属菌 (特開平2-119790)、ファネロケーテ属菌 (特開平3-40887)、ヒラタケ (特開平7-16093) 等の糸状菌由来のキシラナーゼが開示されている。

【0004】しかしながら、これら糸状菌由来のキシラナーゼは全てその最適pHを4.5~6.0に示す酸性キシラナーゼであり、中性において活性を示す中性キシラナーゼは糸状菌からは発見されていなかった。

【0005】一方、上記のような農産廃棄物を家畜等の飼料として利用する場合に、消化を促進させるためのキシラナーゼ処理が提案されている (特開昭53-69178、特表平5-500807)。このような処理を行う場合に使用する酵素は、処理溶液に特別なpH調整の不要な水道水等が利用できる中性キシラナーゼが有利であり、サイロ内などでも直接処理を行うことが可能である。

【0006】また最近、植物組織内で繊維成分であるセルロースと粘着材としてのリグニンが、キシランを介して結合していることが分かり、パルプ産業においてキシラナーゼがにわかに脚光を浴びている。これは、キシラナーゼを用いてキシランを切断すれば、セルロースからの脱リグニンを容易に行えるため、パルプの漂白性が格段に向上するためである。このような目的のために、近年種々の性質のキシラナーゼおよびその処理方法が提案されている (特開平2-264087、特開平3-40887、特開平4-281089、特開平4-316689、特表平5-500087、特開平6-62839、特開平6-261750、特表平6-506593)。

【0007】キシラナーゼ処理により、従来の漂白剤を低減あるいは全く使用せずにパルプ漂白が可能であるならば、環境保全の観点からも非常に有益である。ここで使用され得るキシラナーゼは、中性からアルカリ領域において強い活性を示す酵素が望ましく、また漂白条件により多種類のキシラナーゼから条件に適した酵素を選択できれば、より好都合である。

【0008】さらに近年、キシラナーゼを利用したキシロオリゴ糖の製造方法が提案されている (特開平4-53496、特開平6-261750)。これは、食品のテクスチャー、抗う触性および乳酸菌等の腸内細菌フロラの改善などに、キシロオリゴ糖がマルトオリゴ糖と同様に期待されているためである。

【0009】一方、キシロオリゴ糖の原料としてのキシランは、上記農産廃棄物をアルカリ処理を行うことにより容易に可溶化して得ることができる。処理後のキシラン溶液は、添加したアルカリ成分が消費されており中性～弱アルカリ性であることから、この溶液を直ちに無処理で加水分解するためのキシラナーゼとしては、中性～アルカリキシラナーゼが有利である。

【0010】このような用途に対して、先述のように種々のキシラナーゼが提示されているものの、その多くが酸性あるいはアルカリキシラナーゼである。また特に強力なキシラン加水分解活性の期待できる糸状菌からは、中性以上のpH領域で有効なキシラナーゼは見出されていなかった。

【0011】上記のような観点から、発明者らは中性付近で強力なキシラン分解力を有する中性キシラナーゼを生産する微生物を主にカビ等の糸状菌を中心に検索したところ、耐アルカリ性のアクレモニウム属に属する糸状菌1株が、好氣的培養により目的とする新規中性キシラナーゼを効率良く生産する事を見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明は、産業的に有望な未利用キシランを中性付近で強力に分解することのできる、新規な中性キシラナーゼを提供することを目的としている。

【0013】また本発明は、上記新規中性キシラナーゼを生産する新規微生物、およびその微生物を利用した上記新規中性キシラナーゼの製造法を提供することを目的としている。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明による新規中性キシラナーゼは、以下のような理化学的性質を有するものである。

(a) 作用および基質特異性：各種キシランおよびキシロテトラオース以上のキシロオリゴ糖に特異的に作用し、そのb-キシロシド結合をエンド型の機作により切断して、主にキシロース、キシロビオース、キシロトリオースなどの低分子量のキシロオリゴ糖を生成する。

(b) 最適pH：最適pHは約7.0である。

(c) 安定pH：安定pHは37℃、15分間の処理条件において、pH6.0～10.0で安定である。

(d) 最適温度：最適作用温度は50℃である。

(e) 安定温度：pH7.0、20分間の処理条件において、40℃まで安定であるが、80℃においても15%程度の活性が残存する。

(f) 分子量：約22,500 (SDS電気泳動法)である。

(g) 等電点：約4.7である。

【0015】また、本発明による上記中性キシラナーゼの製造法は、耐アルカリ性アクレモニウム属に属し、上

記中性キシラナーゼ産生能を有する微生物を培養する工程と、該工程で得られた培養物より該新規中性キシラナーゼを分離する工程を含んでなるものである。さらにまた、本発明による上記新規中性キシラナーゼ産性能を有する新規菌株は、アクレモニウム エスピー TOTO-9304株 (FERMP-13639)である。

【0016】本発明による新規中性キシラナーゼは中性付近に最大活性を有し、pH9.0においても50%以上の相対活性を示す。また特に、pH6.0～10.0のアルカリ領域でも安定であり、同領域においてキシランを強力に加水分解する。したがって、家畜等の飼料を消化促進するための酵素処理に使用したり、パルプ製造の際の漂白促進剤として利用すれば極めて効果的である。

【0017】また、機能性食品素材として注目されているキシロオリゴ糖の製造にも応用が可能であり、広範囲の産業分野で利用することができる。また本発明による菌株は、上記中性キシラナーゼを効率良く菌体外に分泌するので、簡便な工程で高効率にその生産を行うことができる点で有利である。

【0018】新規中性キシラナーゼ産生菌株

本発明の新規中性キシラナーゼは、微生物を用いて生産することができる。より好ましくは、本発明による中性キシラナーゼは、アクレモニウム属、特に耐アルカリ性アクレモニウム エスピー (Acremonium sp.) TOTO-9304株により生産される。この菌株は発明者らにより、北九州市の一般家屋浴室のスノコ上より分離されたものである。この菌株は耐アルカリ性であり、その菌学的性質は下記の通りである。

30 【0019】I. 形態的特徴

1 大型分生子：なし

2 分生子：楕円形、2～3mm×3～6mm、1(～2)細胞性、擬頭状

3 分生子柄：短

4 厚膜胞子：なし

5 菌糸：細い

【0020】II. 各培地における生育状況

1 ポテト・デキストロース寒天培地(29℃、11日間培養)

集落直径：61mm

綿毛状、白色、裏面無色

2 ツアベック寒天培地(29℃、11日間培養)

集落直径：56mm

綿毛状、平坦、周辺部は白色で中央部は淡黄色、裏面無色

【0021】III. 生理学的性質

1 生育pH範囲：3.0～11.0

最適生育pH：5.0～10.0 (アルカリ耐性)

2 生育温度範囲：10～50℃

最適生育温度：25～35℃

### 3 中性キシラナーゼの産生能を有する

【0022】以上の性状より、カーマイケルらのジェネラ オブ ハイフォマイセテス (J. W. Carmichael et al. "Genera of Hyphomycetes" (1980)) およびガムスらのセファロスポリウム-アルチゲシンメルビルツ (W. Gamset al. "Cephalosporim-artige Schimmelpilze" (1971)) を参照して検索した結果、本菌株はアクレモニウム属に属する一菌種であることが判明した。しかしながら、本菌株TOTO-9304株のようにpH10以上で生育し、かつ中性キシラナーゼ産生能を有する菌種は本属中には知られていない。

【0023】したがって、本菌株はアクレモニウム属に属する新種であるものと判断し、本菌株をアクレモニウム エスピー (Acremonium sp.) TOTO-9304と命名した。なお、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号第13639号 (FERM p-13639) のもとに寄託されている。

### 【0024】培養条件

上記菌株を培養するための培地は格別である必要はなく、通常の培地を用いることができる。炭素源として各種セルロース・ヘミセルロース (紙、パルプ、キシラン粉末、綿など)、キシロース誘導体、キシラン加工品 (アルカリ酵素キシランなど)、あるいは天然性基質のアルカリ加工品 (アルカリ処理稲ワラ、アルカリ処理麦ワラ、アルカリ処理サトウキビバガスなど)、および小麦フスマ、木粉などの天然性基質、またはグルコース、キシロースやそのオリゴ糖などを使用することができる。

【0025】窒素源としては各種硝酸塩、アンモニウム塩などの無機物、尿素、ペプトン、乾燥酵母、酵母エキス、ダイズ粉、コーンステープリカー、カゼイン、肉エキス、各種アミノ酸などが用いられる。これらの炭素源や窒素源の他に各種の塩、例えばマグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩等を必要に応じて添加しても良い。さらに、別に殺菌した炭酸ナトリウムあるいは炭酸水素ナトリウムなどを添加して培地をアルカリ性としても良い。

【0026】培養は、このような培地中で培養温度20~40℃、好ましくは25~35℃で3日~7日間好気的に攪拌または振とうしながら行う。また、小麦フスマ等を炭素源として用いた場合には、静置培養 (麹培養) を行っても良い。

【0027】本発明による新規中性キシラナーゼは、上記のような条件のもとでの培養により、主として培養液中に分泌され、蓄積される。

### 【0028】酵素の採取

上記培養液から本発明による酵素を採取、精製するためには、既知の精製法を単独もしくは併用して利用するこ

とができる。本酵素は主として菌体外 (培養液中) に分泌されるため、例えば濾過あるいは遠心分離で菌体を除去することにより、容易に粗酵素液を得ることができる。

【0029】こうして得られた粗酵素は、さらに既知の精製法、例えば硫酸等による塩析; メタノール、エタノール、アセトン等の有機溶媒による沈殿法; 不溶性キシランによる吸着法; 限外濾過; イオン交換クロマトグラフィー; ゲル濾過クロマトグラフィー; その他各種クロマトグラフィーを、単独もしくは併用して、精製することができる。

【0030】好ましい精製法を示せば次の通りである。まず培養液に55%以上の飽和硫酸を添加して塩析を行い、得られた沈殿を緩衝液に溶解する。次いで、DEAE-Toyopearl 650M (東ソー株式会社) によりイオン交換クロマトグラフィーを2回繰り返して行う。ここで得られた活性画分を濃縮後、Q-Sepharoseカラム (FPLC: ファルマシア社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーを2回繰り返して行うことにより、回収率20%以上でSDS電気泳動的に均一な精製酵素を得ることができる。

### 【0031】酵素の性質

本発明による新規中性キシラナーゼの性質は次に示される通りである。なお、以下において活性測定法とは次の方法を言うものとする。

【0032】(活性測定法) 1%濃度の可溶性キシラン (シグマ社製) を含む100mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.1mlに、同じ緩衝液に適当に希釈した酵素液0.1mlを加え、37℃、10分間反応させ銅試薬1.0mlを添加して反応を停止した。それに0.8mlの同緩衝液を加えて全量を2.0mlとし、生成した還元糖をSomogyi-Nelson法で測定した。すなわち、これを100℃、15分間加熱した後、流水で急冷し次いでNelson液1.0mlを加え室温で20分間静置して発色させた。

【0033】そこへ、純水7.0mlを加えて不溶物を遠心分離 (3000rpm、10分間) により除去した後、500nmの吸光度を測定した。還元糖量は、キシロースを同様の系で測定して作成した検量線により求めた。なお、酵素液を加える前に銅試薬をあらかじめ加えて同様に発色させたものをブランクとした。また酵素活性単位は、1分間に1mmolの還元糖 (キシロースとして) を生成する酵素量を1単位 (U) とした。

### 【0034】(1) 作用および基質特異性

キシロオリゴ糖およびキシランを基質として、活性測定法に準じて酵素反応を行い、その還元糖の生成量および反応生成物をペーパークロマトグラフィーにより求めた。その結果、本酵素はキシロテトラオース以上のキシロオリゴ糖およびキシランに作用し、そのb 1, 4キシリッド結合をエンド的に特異的に切断し、上にキシ

10

20

30

40

50

ロトリオース以下のキシロオリゴ糖を生成した。主な最終生成物はキシロピオースであり、次いでキシロトリオースが生成した。また、僅かながらキシロースの生成も認められた。

#### 【0035】(2) 最適pHおよび安定pH

本酵素を用いて、pH2.0~10.0の範囲で活性測定法に準じて酵素反応を行った。なお、緩衝液としてpH2.0~3.0; 酢酸・塩酸緩衝液、pH4.0~5.0; 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0~8.0; リン酸緩衝液、pH9.0; トリス・塩酸緩衝液、pH10.0~12.0; ホウ酸ナトリウム・水酸化ナトリウム緩衝液(濃度はいずれの緩衝液についても100mM)を使用した。第1図に活性の最大値を100とした場合の各pHにおける相対活性を示した。第1図から本キシラナーゼの最適pH37℃において7.0であることがわかる。

【0036】同様に本酵素のpH安定性について第2図に示した。本酵素を各pHの緩衝液中に37℃で15分間処理した後、その残存活性を未処理のpH7.0における酵素活性を100とした場合の相対値として示した。第2図より、本酵素は上記条件下においてpH6.0~10.0で安定であり、特にアルカリ側で安定性の高いことが分かる。

#### 【0037】(3) 最適温度および安定温度

上記活性測定法に準じて、本酵素に及ぼす温度の影響を調べた。第3図に最大活性を100とした場合の各温度における相対活性を示した。第3図から、本酵素の最適温度は50℃であることがわかる。

【0038】また、本酵素を100mMリン酸緩衝液(pH7.0)に添加し、30~80℃の範囲の各温度条件下で20分間保持した後、その残存活性を測定した。その結果を第4図に示した。第4図より、本キシラナーゼは40℃まで安定であるが、80℃においても15%以上の活性が残存することがわかる。

#### 【0039】(4) 分子量

本酵素の分子量をSDS電気泳動法により測定したところ、本酵素の分子量は約22,500であった。

#### 【0040】(5) 等電点

本酵素の等電点を等電点電気泳動法により測定したところ、本酵素の等電点は約4.7であった。

#### 【発明の実施の形態】

【0041】本発明を以下の実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0042】実施例1 粗酵素粉末の調製

アクレモニウム エスピーTOTO 9304株の前培養液各2ml (30℃、48時間培養)を、キシラン; 1.0%、酵母エキス; 0.5%、トリトンX-100; 0.1%、硝酸ナトリウム; 0.2%、リン酸二カリウム; 0.1%、硫酸マグネシウム(7水塩);

0.05%、硫酸第一鉄(7水塩); 0.001%、塩化カリウム; 0.05%、炭酸水素ナトリウム; 1.0%を含む培地(pH9.0)100mlを入れた坂口フラスコ(500ml容)20本に植菌し、30℃で5日間、120rpmで振とう培養を行った。培養終了後、培養液を8000rpm、10分間遠心分離を行い菌体を分離した。得られた上清液1805mlを凍結乾燥して、0.073単位/mgの粗酵素粉末5.1gを得た。

#### 【0043】実施例2 精製酵素の調製

実施例1と同様の培地20Lを入れたジャーファメンターに、アクレモニウムエスピー TOTO 9304株の前培養液100mlを植菌した。これを実施例1と同様に培養した後、遠心分離により培養上清液17.8Lを得た。この上清液のpH7.0における活性は0.2単位/mlであった。

【0044】次いで、この上清液に硫酸粉末を5%飽和になるように加え、一夜放置の後8000rpmで10分間遠心分離を行い沈殿を回収した。この沈殿を100mMリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。得られた透析液を、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいたDEAE-Toyopearl 650M(東ソー)によりイオン交換クロマトグラフィーを行った。酵素の溶出は0~0.5M NaClの濃度勾配法により行った。

【0045】さらに、回収した活性画分について上記と全く同条件でDEAE-Toyopearl 650Mにより再クロマトグラフィーを行った。上記イオン交換クロマトグラフィーで得られた部分精製標品について、Q-SepharoseによるFPLC(ファルマシア)を行った。平衡化のための緩衝液系および酵素の溶出は、上記のDEAE-イオン交換クロマトグラフィーと同様の系、方法により行った。

【0046】さらに純度を上げるため、再度全く同一条件でQ-SepharoseによるFPLCクロマトグラフィーを行い、12.2単位/mlの精製酵素液60mlを得た。このものは、SDS電気泳動法において単一のバンドを示し、酵素タンパク質として均一であることが確認された。

#### 【図面の簡単な説明】

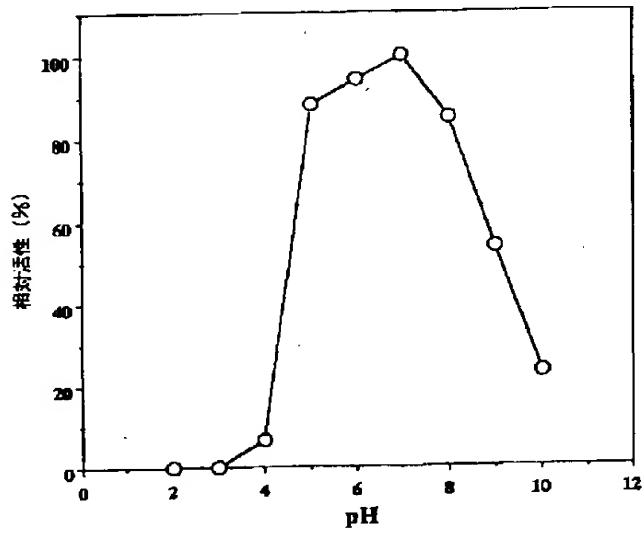
【図1】本発明による新規中性キシラナーゼの最適pHを示すグラフ

【図2】本発明による新規中性キシラナーゼの安定pHを示すグラフ

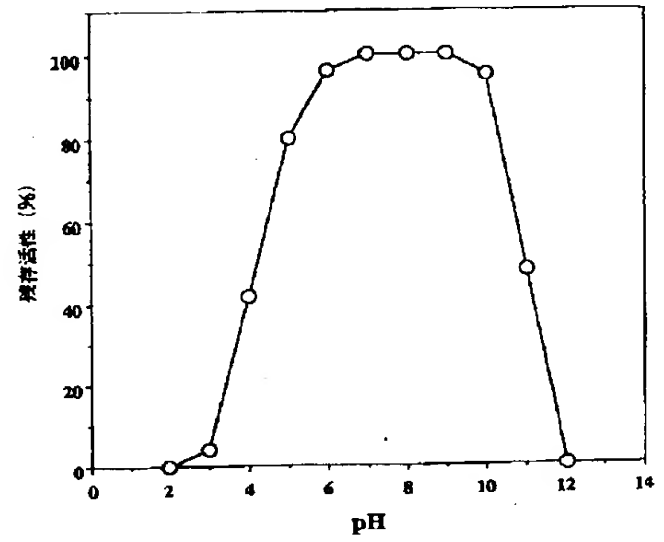
【図3】本発明による新規中性キシラナーゼの最適温度を示すグラフ

【図4】本発明による新規中性キシラナーゼの安定温度を示すグラフ

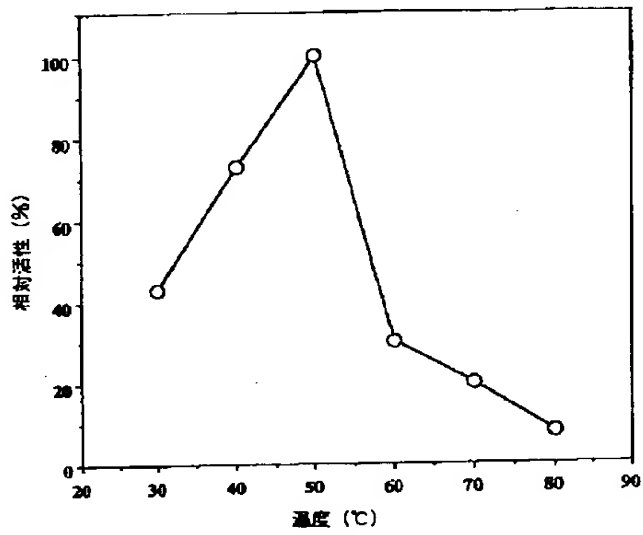
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

